

УДК 576.895.421 : 591.67

© 1995

О ВЕРОЯТНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ
СЛЮНЫ ПЕРЕНОСЧИКА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ СПЕЦИФИЧЕСКИ
КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ

А. Н. Алексеев, В. М. Подборонов, Л. А. Буренкова

Доказано наличие бактерицидных веществ, аналогичных по действию яичному лизоциму в жидкой слюне и цементной пробке иксодовых клещей *Rhipicephalus appendiculatus*. Обсуждается из возможная роль в передаче и сохранении специфически клещевых, не чувствительных к лизоциму возбудителей, таких как риккетсии, вирус клещевого энцефалита и боррелии – возбудителя болезни Лайма. Предполагается, что наличие бактерицидных веществ в цементной пробке предохраняет сконцентрированных в ней клещевых возбудителей (вирус клещевого энцефалита, боррелий) от конкурентного и разрушительного воздействия вульгарной, кокковой микрофлоры и гнойного воспаления, препятствующего как насыщению клеща, так, вероятно, и проникновению специфически клещевых возбудителей в позвоночного хозяина.

Среди многообразных функций слюны иксодовых клещей, обеспечивающих успешное насыщение этих кровососущих членистоногих, имеются и такие, которые способствуют проникновению, закреплению и размножению в организме позвоночного-хозяина возбудителей специфически клещевых инфекций. Подробный разбор именно этих свойств сделан нами ранее (Алексеев, 1993). Присасывание клещей вызывает достаточно выраженную клеточную реакцию, которая, во всяком случае на первых этапах питания клеша, не приводит к значительному отмиранию клеточных элементов крови, характерных для гнойных воспалений, и не сопровождается бурным размножением так называемой вульгарной микрофлоры. Оба процесса „невыгодны” как для длительного питания иксодид, так, вероятно, и для проникновения в их организм специфически клещевых возбудителей. Культивируя вирусы на тканях позвоночных или возбудителей других клещевых инфекций (боррелий, риккетсий), человек вынужден тщательно оберегать их от губительного влияния „посторонней”, „вульгарной” микрофлоры (стрепто, стафило и других кокков, например). И именно эти возбудители обнаружены на покровах клещей (Подборонов, Бердыев, 1991). В том числе, следовательно, и на их гипостоме. Организм клещей, как это показано в многочисленных работах Подборонова, обладает мощными защитными механизмами именно против возбудителей кокковых инфекций. Вместе с тем тот же автор показал, что некоторые „клещевые” возбудители, такие как риккетсии, микробы туляремии и листерики, практически не чувствительны к специфическим, отличающимся по аминокислотному составу лизоцимам как раз тех видов клещей, которые являются их специфическими переносчиками.

Основываясь на не совсем точном переводе одной из работ Подборонова

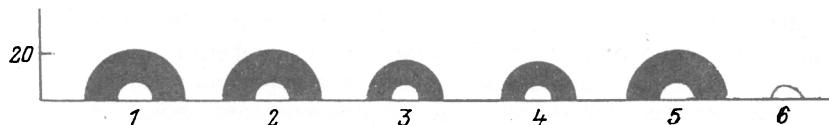
с соавт. (Подборонов и др., 1975), в которой речь шла о лизоциме гомогената целых клещей, Нейтц и Фермейлен (Neitz, Vermeulen, 1987) сделали тем не менее вполне верное предположение о наличии бактерицидного эффекта, которым обладает слюна клещей. Поскольку, по нашим данным, для передачи возбудителей клещевых инфекций имеет особое значение цементная фракция слюны, где концентрируется огромное количество вируса клещевого энцефалита (Алексеев, Чунихин, 1990) и где, судя по нашим предварительным данным и по данным литературы (Pollack e. a., 1991), могут депонироваться и боррелии – возбудители болезни Лайма, особый интерес представляет изучение бактерицидных свойств цементной пробки слюны клещей, образуемой в первые часы их присасывания к коже хозяина, когда, по нашим представлениям, в ней накапливаются возбудители специфически клещевых инфекций. В качестве прокормителя были избраны морские свинки – животные, способные при повторных кормлениях клещей вырабатывать резистентность к их укусам (Балашов, 1993) и не чувствительные к вирусу клещевого энцефалита. Цементные пробки были получены от *Rhipicephalus appendiculatus*, свойства слюны которых, судя по результатам дистантной передачи вируса клещевого энцефалита на животных с подпороговой вирусемией, наиболее близки к таковым у специфических переносчиков КЭ и болезни Лайма – клещей *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus* (Алексеев, Чунихин, 1992; Labuda e. a., 1993). Пара *R. appendiculatus* – морская свинка была выбрана именно потому, что лабораторная культура этого вида клещей ведется на этих животных и хорошо к ним адаптирована. Для обнаружения бактерицидных свойств цементной пробки и жидкой слюны не имела принципиального значения специфичность переносчика, так как мы полагали, исходя из прошлого опыта, что и гомогенаты целых иксодовых клещей, и продукты их слюнных желез, равно как и сами выпаренные слюнные железы, могут обладать антиковковой активностью, что, разумеется, отнюдь не исключает усиления этих свойств под влиянием репродукции возбудителей в их основных переносчиках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Прокормители – морские свинки, ранее не использовавшиеся для кормления клещей.

Клетки – *R. appendiculatus*, лабораторная культура, полученная из лаборатории в Англии (Оксфорд, NERC).

Цементные пробки извлекались из кожи морской свинки в начале вторых суток присасывания клещей путем аккуратного иссечения участка кожи и последующего высвобождения из него вещества конуса. Стандартизация масс конусов при этом не достигается и различия в бактерицидной активности конусов самок и самцов не могли быть нивелированы использованием равных объемов жидкости при их последующем титровании. Напротив, объем жидкой слюны поддавался стандартизации благодаря использованию предварительно калиброванных капилляров, в которые вставляли ротовые органы самок, освобожденных от цемента для получения слюны. Этот прием позволяет судить и о концентрации бактерицидного вещества. Слюнные железы выпаривались у одних особей, гомогенаты целых клещей приготавливали из других. Железы извлекались стандартным, отработанным еще Е. Н. Павловским методом – путем рассечения хитиновых покровов спинной стороны фиксированного клеща и извлечения желез *in toto*. Гомогенаты цементных пробок готовили путем растирания в стерильных условиях в ступке с песком и равными объемами физиологического раствора. Гомогенаты желез готовили сходным образом, причем объем гомогената зависел от величины



Зоны лизиса, вызываемые слюной или гомогенатами органов самки *Rhipicephalus appendiculatus* на газоне с убитой культурой *Micrococcus lysodeikticus*.

По оси ординат — диаметр зоны лизиса в мм; по оси абсцисс — образцы зон лизиса; 1 — контроль, яичный лизоцим; 2 — неразведенная жидккая слюна; 3 — гомогенат цементного конуса; 4 — то же, целых слюнных желез; 5 — то же, целого клеща; 6 — физиологический раствор; светлый кружок внутри зоны лизиса — фильтровальная бумага, на которую наносится испытуемая жидкость.

Lysis area produced by the organ homogenates or saliva of *Rhipicephalus appendiculatus* on the surface of the killed *Micrococcus lysodeikticus* culture.

органов и составлял от 0.1 до 0.3 мл. Для титрования, однако, использовали всегда один и тот же объем — 0.1 мл. Гомогенаты подвергали троекратному замораживанию и оттаиванию, затем центрифугировали со скоростью 9000 об./мин в течение 15 мин; центрифугат подвергали исследованию на наличие антибактериальных свойств по отношению к *Mycobacterium lysodeikticus*, для чего смоченные им диски помещали на газон с культурой этого микробы.

В качестве контролей использовали физиологический раствор и яичный лизоцим (0.78 мг/мл).

Учеты размеров зоны лизиса проводили через 24 и 48 ч, с повторной проверкой в течение 3–5 сут, о результатах антибактериального действия судили по максимальному диаметру зоны лизиса в мм. В некоторых случаях (для наглядности) использовали убитую культуру *M. lysodeikticus* (см. рисунок). Размеры зон лизиса документированы фотографированием в масштабе 1 : 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рисунка и таблицы, бактерицидная активность слюны и гомогенатов слюнных желез клещей не слишком, хотя и достоверно, отличается от контроля — лизоцима куриного яйца, взятого в качестве эталона. Активность субстратов, полученных из самок, почти во всех случаях достоверно выше таковой самцов, что, вероятно, необходимо ввиду гораздо более длительного периода их присасывания. Особенно разительна разница в бактерицидной активности гомогенатов цементных конусов: у длительно питающихся самок она в 1.7 раза выше, чем у самцов. Различия между активностью жидкой слюны гораздо меньше и при принятых в биологии критериях достоверности (95 % и более) могут считаться несущественными. Этот факт, а также существенность разницы в активности субстрата целых слюнных желез позволяет предполагать, что последняя зависит от большего богатства бактерицидными веществами именно предшественников цементной фракции слюны. Тело целого клеща самца богаче лизоцимом, нежели его слюнные железы (разница 0.01 — достаточно достоверна), тогда как для самок она практически отсутствует, что позволяет полагать, что практически весь запас бактерицидных веществ голодной самки сосредоточен в ее слюнных железах.

Заметное и достоверное отличие в бактерицидной активности жидкой слюны по сравнению с цементным конусом (см. рисунок, 2, 3 диаметры зон лизиса в 18 и 14, 15.8 и 8.2 мл — в таблице) могут объясняться не столько большей активностью именно жидкой фракции слюны, сколько техникой приготовления гомогената,

Бактерицидная активность слюны и гомогенатов органов клещей
Rhipicephalus appendiculatus на живой культуре микробов *Micrococcus lysodeikticus*

Bactericidal activity of saliva and organ homogenates of *Rhipicephalus appendiculatus*
ticks on the surface of alive *Micrococcus lysodeikticus* culture

Испытанный субстрат	Диаметр зоны лизиса, мм		Достоверность разницы
	самка	самец	
Гомогенат			
целого клеща	15.6 + 0.22 (5)	13.8 + 0.52 (5)	0.01
слюнных желез	15.4 + 0.46 (5)	11.0 + 0.63 (5)	0.001
цементного конуса	14.0 + 0.28 (5)	8.2 + 0.33 (5)	0.001
Жидкая слюна	18.0 + 0.63 (5)	15.8 + 0.77 (5)	0.06
Контроль			
яичный лизоцим	20.44 + 0.35 (9)		< 0.01*
физиологический раствор	0		—

* 99 % и более достоверная разница со всеми пробами от клещей; в скобках — число повторностей.

при которой неизбежно теряется часть активнодействующего вещества (возможно, за счет адсорбции на частицах песка, см. методику). Жидкая слюна использовалась в нативном виде.

Полученные результаты позволяют утверждать, что, во всяком случае в первые сутки присасывания клещей, специфические клещевые возбудители обеспечиваются надежной защитой от конкурирующей, вызывающей гнойное воспаление микрофлоры внутри цементного конуса, а загрязненный любыми микробами хоботок клеща омыается и обеззараживается богатой бактерицидными веществами жидкой слюной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказанное присутствие в слюне клещей, в жидкой и цементной ее фракциях, бактерицидных веществ объясняет сохранение и легкую передачу позвоночным специфически клещевых возбудителей нечувствительных к лизоцимам клещей, в частности таких как риккетсии, нечувствительность которых экспериментально доказана (Подборонов, Бердыев, 1991).

Массивное накопление в цементном конусе, сохранение в нем и обилие в жидкой слюне вируса клещевого энцефалита (Алексеев, Чунихин, 1990) служат, с одной стороны, доказательством его нечувствительности к бактерицидным веществам слюны (лизоциму?) иксодид и доказательством „защиты” самого вируса от конкуренции вульгарной микрофлоры — с другой. Теми же свойствами обладают, видимо, и боррелии. Можно а priori утверждать, что *Borrelia burgdorferi sensu lato* окажется нечувствительной к клещевому лизоциму. Способы, аналогичные применяемым человеком для получения чистых культур клещевых возбудителей, вероятно, более экономно и эффективно используются природой в процессах перехода возбудителей трансмиссивных инфекций от беспозвоночного к позвоночному хозяину.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 94-04-12 099

Список литературы

- Алексеев А. Н. Система клещ—возбудитель и ее эмерджентные свойства. СПб.: ЗИН РАН. 1993. 204 с.
- Алексеев А. Н., Чуничин С. П. Передача вируса клещевого энцефалита иксодовыми клещами в эксперименте (механизмы, сроки, видовые и половые различия) // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 3. С. 177–185.
- Алексеев А. Н., Чуничин С. П. Различия в дистантной передаче вируса клещевого энцефалита иксодовыми клещами двух подсемейств // Паразитология. 1992. Т. 26, вып. 6. С. 506–515.
- Балашов Ю. С. Значение видовой принадлежности иксодовых клещей и их хозяев в развитии противоклещевого иммунитета / Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 6. С. 369–377.
- Подборонов В. М., Бердыев А. Защитные механизмы иксодоидных клещей и их прокормителей (паразитохозяйственные взаимоотношения). Ашхабад: Илым, 1991. 240 с.
- Подборонов В. М., Гроховская И. М., Степанченок-Рудник Г. И. Получение и свойства бактерицидного вещества, выделенного из клещей *Orientalia papillipes* // Мед. паразитол. 1975. Т. 44. № 6. С. 716–719.
- Labuda M., Jones L. D., Williams T., Danielova V., Nuttall P. A. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks // J. Med. Entomol. 1993. Vol. 30. N 1. P. 295–299.
- Neitz A. W. H., Vermeulen N. M. J. Biochemical studies on the salivary glands and haemolymph of *Amblyomma hebraeum* // Onderstepoort J. Vet. Res. 1987. Vol. 54. P. 443–450.
- Pollack R. J., Telford (III) S. R., Spielman A. Protection of mice against Lyme disease infection by ear punch biopsy // Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1991. Vol. 45. N 3. P. 206.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034;
Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
РАМН, Москва
Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
РАМН, Москва, 142782

Поступила 15.12.1993

PROBABLE UTILIZATION OF THE DEFENSIVE QUALITIES OF THE VECTOR SALIVA BY THE SPECIFIC TICK-BORNE PATHOGENS

A. N. Alekseev, V. M. Podboronov, L. A. Burenkova

Key words: tick, saliva, lysozyme, tick-borne pathogen, protection.

SUMMARY

It is proved that in the tick fluid saliva and in the cement plug produced by *Rhipicephalus appendiculatus* there are bactericidal substances very similar in their activity to the egg lysozyme. The possible role in the transmission and conservation of the specific tick-borne, insensitive to the lysozyme pathogens such as rickettsiae, tick-borne encephalites virus and borreliae (pathogen of Lyme disease) is discussed. It is supposed, that bactericidal substances in the cement plug protect accumulated in it the tick-borne pathogens (TBE virus, borreliae) from the compete and destructive influence of the vulgar, mainly coccal microflorae and from the purulent inflammation, which hinders not only tick feeding but probably specific tick-borne pathogens spreading in the vertebrate host.